

УДК 57.085.23, 57.089.67

Оценка влияния модификации коллагеном I типа поверхности остеозамещающего материала «БИОСИТ-СР ЭЛКОР» на жизнеспособность мезенхимных стромальных клеток костного мозга

Касьянова Е.С.², Копелев П.В.^{1,2}, Александрова С.А.¹¹ФГБУН «Институт цитологии» РАН, Санкт-Петербург,²ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург

Analysis of the viability of bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated on osteoreplacement material BIOSIT-SR ELCOR after surface modification by collagen type I

Kasyanova E.S.², Kopelev P.V.^{1,2}, Alexandrova S.A.¹¹FSFIS "Institute of Cytology" RAS, Saint-Petersburg,²FAEI HE "Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University", Saint-Petersburg

Аннотация

Оценено влияние покрытия биокерамического материала «Биосит-Ср Элкор» коллагеном I типа на морфологию и жизнеспособность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга кролика. Для оценки основных клеточных характеристик использовали методы прижизненной световой микроскопии, сканирующей электронной микроскопии и МТТ-тест. Показано, что после модификации материала по предложенной нами методике морфология клеток и их жизнеспособность практически не отличались от характеристик клеток в контрольных лунках. Можно заключить, что модификация поверхности «Биосит-Ср Элкор» коллагеном I типа улучшает характеристики материала, необходимые для использования его в качестве скаффолда в составе тканеинженерных эквивалентов костной ткани.

Ключевые слова: регенеративная медицина, тканевая инженерия, остеозамещающие материалы, биоситалл, гидроксиапатит, даллит, «Биосит-Ср Элкор», мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга, коллаген I типа, жизнеспособность.

Введение

Актуальность данного исследования обоснована необходимостью поиска и разработки новых материалов для остеопластики. В связи с ограниченностью и биологической опасностью естественных костнозамещающих материалов в настоящее

Abstract

The influence of the collagen I type coating of bioceramic material "Biosit-Sr Elcor" on the morphology and viability of the multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) of the rabbit bone marrow has been estimated. To evaluate cell parameters, methods of intravital light microscopy, scanning electron microscopy and MTT test were used. It was shown that after the modification of the material according to the developed scheme, the morphology of the cells and their viability did not differ from the control ones. It can be concluded that after such preparation, "Biosit-Sr Elcor" is suitable for use as a scaffold for bone tissue engineering.

Keywords: regenerative medicine, tissue engineering, osteoreplacement materials, biositall, hydroxyapatite, dallit, «Biosit-Sr Elcor», multipotent mesenchymal stromal cells, type I collagen, viability.

время активно идет разработка искусственные материалов - на основе различных металлов, керамики, полимеров и т.п. Идеальный остеозамещающий материал должен, кроме механической прочности, обладать остеоиндуктивными свойствами и активной остеointеграцией [1, 2]. Большое внимание

исследователей привлекает идея использования в костной пластике искусственных материалов, идентичных минеральному компоненту кости, таких как биокерамика. Керамические имплантаты обладают устойчивостью к высоким температурам, износу, коррозионной и эрозивной стойкостью, прочностью [3, 4]. Класс биокерамических материалов «биоситаллы» изготавливают на основе стеклокристаллической системы $\text{CaO} - \text{MgO} - \text{SiO}_2 - \text{P}_2\text{O}_5$. Они обладают уникальным сочетанием различных характеристик: механической прочностью, биосовместимостью и остеоиндуктивностью. Благодаря таким свойствам при имплантации биоситаллов не формируется фиброзная капсула, костная ткань прорастает в материал, связываясь с ним [5]. Однако в некоторых случаях имплантация стеклокерамических материалов может вызывать различные осложнения, обусловленные технологическими процессами при производстве материала [6].

Среди отечественных биоситаллов одним из наиболее хорошо изученных остеозамещающих материалов является «Биосит-Ср Элкор», разработанный на основе биоситалла М-31 в Санкт-Петербургском технологическом университете [7]. Уникальная особенность этого материала заключается в его составе: кристаллическая фаза (~3 % объема) состоит из природного гидроксипатита - даллита (карбонсигидроксиапатита). Этот материал удовлетворяет всем необходимым требованиям для остеозамещающих материалов и на данный момент используется в клинической практике. В наших предыдущих исследованиях «Биосит-Ср Элкор» был выбран для изучения возможности использования его в качестве подложки для роста мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга (КМ) [8]. Была дана оценка морфологических характеристик и жизнеспособности ММСК КМ кролика при культивировании *in vitro*: непосредственно на гранулах биоситалла разных фракций и в экстрактах биоситалла. Также в данном исследовании было выявлено выкрашивание микрочастиц из состава материала и доказано их негативное влияние на жизнеспособность ММСК кролика. Была предложена схема обработки материала, улучшающая жизнеспособность при росте на нем клеток.

Характеристики «Биосит-Ср Элкор» позволяют рассматривать его в качестве скаффолда для применения в тканевой инженерии в составе тканеинженерного эквивалента кости (ТИЭК). ТИЭК состоит из двух

основных частей: остеозамещающего материала и стволовых клеток. Основными задачами при разработке ТИЭК являются - выбор адекватного материала, его подготовка и оптимизация процесса прикрепления (адгезии) клеточной культуры на его поверхности. Во многих случаях именно адгезия клеток на материале является критическим этапом при создании ТИЭК [9]. Перспективным способом улучшения поверхности материалов для заселения их клетками является иммобилизация на них белков внеклеточного матрикса. Большую часть (~90%) костного матрикса составляют фибриллы коллагена I типа. Структура и свойства коллагена в настоящее время хорошо изучены. Было показано, что ММСК демонстрируют выраженную адгезивность к нему и высокую способность к пролиферации на коллагеновых носителях *in vitro* [10]. Кроме того, оказалось, что коллаген I типа способствует остеогенной дифференцировке ММСК [11]. Такие свойства позволяют использовать коллаген костной ткани для создания биоматериалов для остеопластики [12].

Цель данной работы заключалась в исследовании жизнеспособности ММСК КМ кролика при росте на поверхности гранул биоситалла «Биосит-Ср Элкор», модифицированной коллагеном I типа.

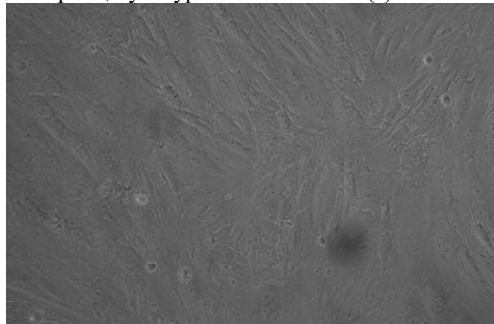
Материалы

Культуру ММСК костного мозга кролика получали из костей конечностей новорожденного кролика породы Шиншилла по стандартной методике [13]. Клетки культивировали в питательной среде α MEM (Sigma, США) с 0,5 %-ным содержанием глутамина (Росмедбио, Россия) и 10% СЭК (Nuclease, США) в присутствии 1% раствора антибиотиков Pen Strep (Lonza, Бельгия). В качестве подложки для роста клеток использовали биоситалл силикоалюмофосфатной группы «Биосит-Ср Элкор» («ЭЛКОР», Санкт-Петербург, РФ) в виде гранул неправильной формы диаметром 0,1-0,3 мм. Раствор коллагена I типа, полученный путём кислой экстракции из сухожилий крысиных хвостов, был любезно предоставлен сотрудником Института цитологии РАН Кухаревой Л.В. [14].

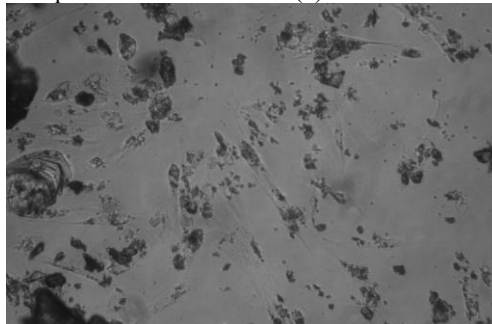
Методы

Подготовка гранул биоситалла для культивирования клеток. Обработку материала проводили с учетом результатов, полученных в предыдущих экспериментах [8]. Гранулы «Биосит-Ср Элкор» (0,1-0,3 мм) 4 раза промывали полной ростовой средой с

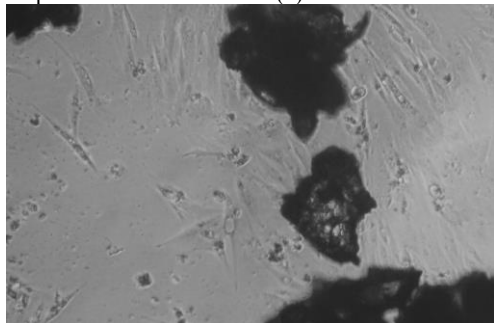
Контроль, культуральный пластик (а)



Необработанный биоситалл (б)



Обработанный биоситалл (в)



Обработанный и покрытый коллагеном (г)

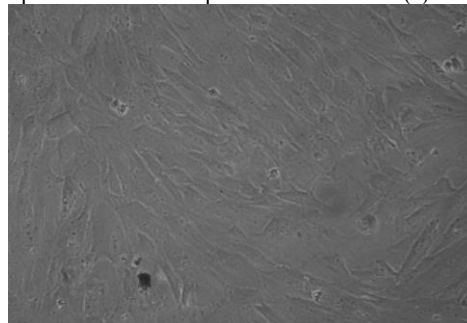


Рис.1. ММСК КМ после инкубации в течение 3 сут на гранулах «Биосит-Ср Элкор» с различной обработкой. Световая микроскопия. Ув. 200х.

10%-ным содержанием СЭК. Концентрированный раствор коллагена I типа разводили в 0,001%-ном растворе уксусной кислоты до концентрации 100 мкг/мл и помещали в лунки с биоситаллом в таком количестве, чтобы он покрывал гранулы целиком, оставляли на 30 мин при 370С, убирали несвязавшийся с поверхностью белок, промывали биоситалл фосфатно-солевым буфером и ростовой средой. В результате такого способа нанесения на поверхности гранул биоситалла формировался тонкий слой белка в молекулярной форме [15].

Микроскопические методы оценки клеточной морфологии.

На обработанные гранулы биоситалла сажали ММСК с плотностью 50 тыс. кл/лунку. Осуществляли прижизненное наблюдение в процессе культивирования клеток под инвертированным микроскопом Nikon Eclipse TS100, оснащенный фотокамерой, в течение 3 сут. Кроме того, ММСК после культивирования в течение 3 сут были зафиксированы в растворах глutarового альдегида и этанола нарастающей концентрации для изучения с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Напыление слоем золота образцов было проведено Мухиным И.С. на установке SPI-

Module Sputer Coater (ИТМО). Исследование клеточной морфологии проводилось на микроскопе с энергодисперсионным детектором EDAX при ускоряющем напряжении 20kV и времени экспозиции 3-30 мксек Гайдашем А.А.

Оценка жизнеспособности клеток методом МТТ-теста.

Жизнеспособность клеток после культивирования на обработанных гранулах биоситалла оценивали через 3 сут. Положительным контролем являлись ММСК при росте на стандартном культуральном пластике, в качестве отрицательного контроля использовали ММСК после инкубации на необработанных гранулах биоситалла. Опыт проводили в 24-луночной планшете в трех повторностях. МТТ-тест: в опытные и контрольные лунки с ММСК добавляли 10% от объема ростовой среды стокового раствора МТТ (5 мг/мл) и помещали в CO₂-инкубатор на 3 ч. Среду отбирали, образовавшиеся в клетках кристаллы формазана растворяли диметилсульфоксидом (Биолот, РФ). Оптическую плотность (ОП) полученного раствора измеряли на иммунохимическом анализаторе Fluorofot "Charity" при длине волны 570 нм с референсной длиной волны 630 нм. Статистическую обработку

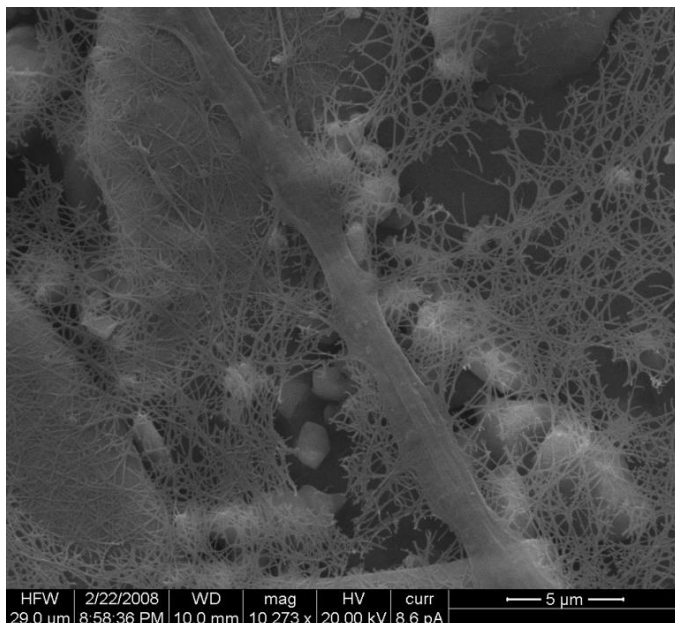


Рис.2. ММСК КМ после инкубации в течение 3 сут на грануле «Биосит-Ср Элкор», покрытой коллагеном. СЭМ.

полученных данных осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2016. Вычисляли среднее значение и ошибку среднего ОП, на основании которых строили диаграмму.

Результаты

Исследование морфологии клеток при росте на гранулах биоситалла.

При прижизненном наблюдении методом световой микроскопии были отмечены значительные изменения морфологии клеток, инкубировавшихся в лунках с нативными (без дополнительной обработки) гранулами «Биосит-Ср Элкор»: сильная вакуолизация, наличие большого количества включений в цитоплазме (Рис. 1б). В варианте опыта, в котором использовался материал после его обработки полной питательной средой, количество включений в клетках и признаки вакуолизации были значительно меньше (Рис. 1в). Тем не менее, количество адгезировавших к поверхности (наблюдаемых в поле микроскопа) клеток было ниже, чем в контроле. А при культивировании клеток в лунках с обработанными и покрытыми тонким слоем коллагена I типа гранулами биоситалла (Рис. 1г) - морфология клеток практически не отличалась от контрольной (Рис. 1а), клетки монослоем покрывали всю поверхность лунки.

После 3-суточной инкубации ММСК на гранулах биоситалла, покрытых раствором коллагена, с помощью СЭМ было выяв-

лено, что на поверхности гранул формируется пленка из коллагеновых волокон (Рис. 2). Коллагеновые волокна образовали сетчатую структуру, оплетающую микрочастицы, выкрашивающиеся из материала. Клетки хорошо адгезировали на поверхности пленки и приняли вытянутую, разветвленную форму.

Исследование жизнеспособности клеток при росте на гранулах биоситалла.

Исследование с помощью МТТ-теста выявило, что жизнеспособность клеток при культивировании на гранулах «Биосит-Ср Элкор» после различных способов обработки отличается (Рис. 3). Самые низкие значения ОП оказались у клеток, которые культивировались на нативных гранулах биоситалла - ОП оказалась в 3.09 раз ниже ОП в контроле. ОП клеток, которые инкубировались на обработанных средой гранулах, тоже была ниже, чем в контроле, но не так значительно - в 1.31 раза. При этом она была в 2.36 раза выше, чем ОП клеток на нативном материале. Наиболее высокая, сопоставимая с контролем, ОП была выявлена у клеток, которые культивировались на гранулах материала, обработанных средой и покрытых коллагеновым гелем.

Обсуждение

В результате проведенных исследований было выявлено, что обработка гранул биоситалла средой и покрытие коллагеном способствует тому, что ММСК КМ сохраняют свою морфологию и жизнеспособность при росте на гранулах и в их присутствии в культуральном сосуде. Ранее нами было выявлено, что низкая жизнеспособность ММСК при инкубации в экстрактах «Биосит-Ср Элкор» была связана с наличием микрочастиц, которые в большом количестве образуются при производстве, а также выкрашиваются при транспортировке и манипуляциях с материалом [8]. Было показано, что микрочастицы поглощаются клетками и негативно влияют на внутриклеточные процессы, вызывают гибель клеток. Были предложены способы избавления от микрочастиц, позволившие повысить жизнеспособность клеток. Тем не менее, спонтанное образование микрочастиц во время

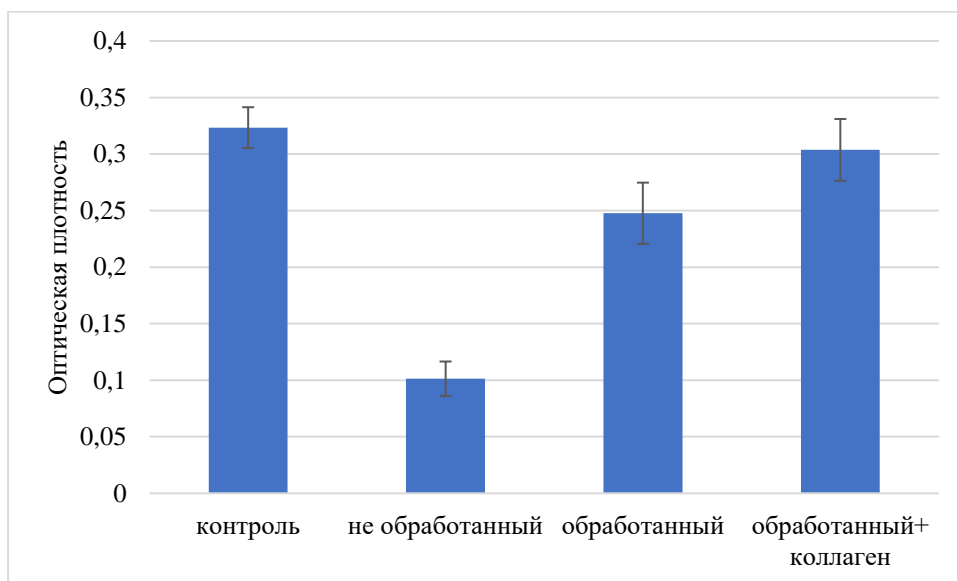


Рис.3. Жизнеспособность ММСК КМ при инкубации на гранулах «Биосит-Ср Элкор» с различной обработкой. МТТ-тест.

культивирования *in vitro* и низкая адгезивность биоситалла оказывали негативное влияние на функционирование клеток при длительном культивировании.

В составе костной ткани белки внеклеточного матрикса играют значительную роль в сохранении и функционировании клеток. Коллаген I типа является мажорным белком костной ткани. Поэтому было предложено использовать коллагеновый гель в качестве модификатора поверхности «Биосит-Ср Элкор» для улучшения условий культивирования клеток. Наши исследования морфологии и распределения клеток микроскопическими методами выявили, что при модификации поверхности «Биосит-Ср Элкор» тонким слоем молекулярного коллагена клетки хорошо адгезировали на поверхности материала, имели обычную морфологию и активно распространялись по поверхности. Клетки принимали вытянутую, разветвленную (фибробластоподобную) форму. Коллагеновые волокна формировали сетчатую структуру, к которой клетки прикреплялись своими филоподиями. Кроме того, эта сеть оплетала микрочастицы, окрашивающиеся из материала. Возможно, коллагеновый гель удерживал микрочастицы, что способствовало нормальному функционированию клеток. МТТ-тест показал, что модификация поверхности материала коллагеном приводила к увеличению жизнеспособности всей клеточной

популяции. Влияние коллагена может проявляться не только в механической преграде и защите клеток от микрочастиц, но и в изменении их функции. Взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом обычно сопровождается образованием фокальных контактов и перестройкой цитоскелета, что влияет на активность разных групп генов, отвечающих за процессы пролиферации, апоптоза, дифференцировки и др. В литературе опубликованы исследования, демонстрирующие, что наличие коллагена I типа способствует остеогенной дифференцировке ММСК КМ [11] и ускоряет процессы минерализации костной ткани.

Можно заключить, что перед применением в клинике материал «Биосит-Ср Элкор» необходимо модифицировать по следующей схеме: промыть не менее четырех раз полной ростовой средой с 10%-ным содержанием СЭК и покрыть тонким слоем коллагена I типа (100 мкг/мл). Кроме того, после такой обработки «Биосит-Ср Элкор» можно использовать в качестве скаффолда для ММСК КМ при создании тканеинженерных эквивалентов костной ткани.

Авторы выражают глубокую благодарность за помощь в получении результатов сканирующей электронной микроскопии сотрудникам Гайдашу А.А. и Мухину И.С.

Список литературы

1. Дубок В.А., Проценко В.В., Шинкарук А.В. Новое поколение биоактивных керамик – особенности свойств и клинические результаты // Ортопедия, травматология и протезирование. 2008. № 3. С. 91–95.
2. Thitiset T., Damrongsakkul S., Bunaprasert T. Development of collagen/demineralized bone powder scaffolds and periosteum-derived cells for bone tissue engineering application // Int J Mol Sci. 2013. № 14. P. 2056–2071.
3. Артамонова О.В., Альмяшева О.В., Миттова И.Я. Спекание нанопорошков и свойства керамики в системе ZrO_2 – In_2O_3 // Перспективные материалы. 2009. № 1. С. 91–94.
4. Гордеев Ю.И., Абкарян А.К., Зеер Г.М. Конструирование и исследование твердосплавных и керамических композитов, модифицированных наночастицами // Перспективные материалы. 2012. № 5. С. 76–87.
5. Кирилова И.А., Садовой М.А., Подорожная В.Т. Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства // Хирургия позвоночника. 2012. №3. С. 72–83.
6. Yuan H., de Bruijn J.D., Zhang X. Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (45S5) // J Biomed Mater. Res. 2001. № 58. P. 270–276.
7. Елагина И.А., Аносов Н.А., Лысенюк Л.Н. Остеозамещающий материал нового поколения для изделий «Биосит» // Lab. Lambert Academic Publishing. 2014. С.61
8. Касьянова Е.С., Александрова С.А., Сердобинцев М.С., Блинова М.И. Жизнеспособность мезенхимных мультипотентных стромальных клеток при росте на биокерамическом материале «БИОСИТ-СР ЭЛКОР» // Бюллетень инновационных технологий. 2017. № 1(4). С. 44–51.
9. Николаенко Н.С., Цупкина Н.В., Деев Р.В., Патокин И.Л., Лысенюк Л.Н., Орлов В.П., Гололобов В.Г., Пинаев Г.П. Культивирование остеогенных клеток различного происхождения на биоситаллах силикоалюмофосфатной группы с целью создания остеозамещающих имплантатов // Информационный бюллетень «Клеточные культуры» СПб, изд-во Политехн. Ун-та. 2004. № 19. С. 10–16.
10. Liu G.L., Hu Y.Y., Zhao J.N., Wu S.J., Xiong Z., Lu R. Effect of type I collagen on the adhesion, proliferation, and osteoblastic gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells // J Traumatol. 2004. № 7(6). P. 358–62.
11. Mizuno M., Kuboki Y. Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen // J. Biochem. 2001. №129(1). P.133–8.
12. Иванов С.Ю., Ларионов Е.В., Панин А.В., Кравец В.М., Анисимов С.И., Володина Д.Н. Разработка биоматериалов для остеопластики на основе коллагена костной ткани // Клиническая стоматология. 2005. № 4. С. 1–3
13. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. 1999. Vol. 284. P. 143–147.
14. Кухарева Л.В., Парамонов Б.А., Шамолина И.И., Семенова Е.Г. Способ получения коллагена для лечения патологий тканей организма. Патент №2214827.
15. Швед Ю. А., Кухарева Л. В., Зорин И. М., Блинова М. И., Билибин А. Ю., Пинаев Г. П. Взаимодействие культивируемых клеток кожи с разными структурными формами коллагена, нанесенного на полилактидную матрицу // Цитология. 2007. Т. 49. № 1. С.32–25.

Поступила в редакцию 10.08.2018

Сведения об авторах:

Касьянова Елизавета Сергеевна – студент магистратуры кафедры Медицинская Физика Санкт-Петербургского политехнического университета имени Петра Великого. E-mail: k_elisa@bk.ru

Копелев Павел Владимирович – студент магистратуры кафедры Медицинская Физика Санкт-Петербургского политехнического университета имени Петра Великого; старший лаборант-исследователь Лаборатории Клеточных Биотехнологий Центра Клеточных Технологий Института Цитологии РАН. E-mail: paxa94@bk.ru

Александрова Светлана Алексеевна - кандидат биологических наук, научный сотрудник Лаборатории Клеточных Биотехнологий Центра Клеточных Технологий Института Цитологии РАН. E-mail: alekssvet2205@gmail.com

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-50-00068 «Стволовые клетки - основа клеточных технологий»